

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-250681

(43) 公開日 平成7年(1995)10月3日

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09		9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数4 F D (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平6-69961

(22) 出願日 平成6年(1994)3月15日

(71) 出願人 000134486

株式会社トミー精工

東京都練馬区旭町2丁目2番12号

(72) 発明者 藤城 正俊

東京都練馬区旭町2丁目2番12号 株式会

社トミー精工内

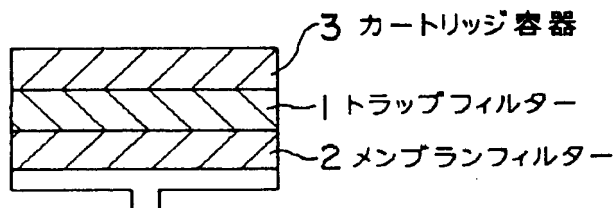
(74) 代理人 弁理士 奥山 尚男 (外4名)

(54) 【発明の名称】 DNA抽出精製方法及び装置

(57) 【要約】

【目的】 形質転換体で複製増幅された核外遺伝子DNA (プラスミドDNA) を、終夜培養液から安価に抽出精製することのできるDNA抽出精製方法及び装置を提供する。

【構成】 (1) 形質転換体培養液を第1のDNA抽出精製用カートリッジに集菌する工程、(2) 溶菌及び不要RNAの分解工程、(3) 第1のDNA抽出精製用カートリッジによる不純物濾過工程、(4) 第2のDNA抽出精製用カートリッジでDNAを吸着、洗浄、溶出する工程を含むプラスミドDNAの抽出精製方法、及び少なくともトラップフィルター及びメンブランフィルターを含む第1のDNA抽出精製用カートリッジと、少なくともガラス繊維フィルターとガラスパウダー層とメンブランフィルターとを含む第2のDNA抽出精製用カートリッジとを含むDNA抽出精製装置。



1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (1) 形質転換体培養液を第1のDNA抽出精製用カートリッジに集菌する工程、(2) 溶菌及び不要RNAの分解工程、(3) 第1のDNA抽出精製用カートリッジによる不純物濾過工程、(4) 第2のDNA抽出精製用カートリッジでDNAを吸着、洗浄、溶出する工程を含むプラスミドDNAの抽出精製方法。

【請求項2】 少なくともトラップフィルター及びメンブランフィルターを含む第1のDNA抽出精製用カートリッジと、少なくともガラス繊維フィルターとガラスパウダー層とメンブランフィルターとを含む第2のDNA抽出精製用カートリッジとを含むDNA抽出精製装置。

【請求項3】 請求項2のDNA抽出精製装置の実施に直接使用する請求項2の第1のDNA抽出精製用カートリッジ。

【請求項4】 請求項2のDNA抽出精製装置の実施に直接使用する請求項2の第2のDNA抽出精製用カートリッジ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、多検体試料からDNAを短時間に抽出精製するDNA抽出精製方法及び装置に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来、大腸菌等を形質転換した形質転換体からプラスミドDNA（核外遺伝子）を抽出精製する方法として、煮沸法 [BOILING METHOD (Holmes, D. S. 及びM. Quigley, 1981, Anal. Biochem. 114:193)] やアルカリ溶菌法 [ALKALINE LYSIS METHOD (Birnboim, H. C. 及びJ. Doly, 1979, Nucleic Acids Res. 7:151 3)] 等が行われている。しかし、これらの方法は、フェノール、クロロホルム等の危険試薬を使用し、手間のかかる方法であった。さらに、高純度の精製試料を得る方法として、塩化セシウム密度勾配遠心分離法によるプラスミドDNAの抽出精製方法がある。この方法は、高純度精製の代表的なものであるが、実施に長時間を要し、試料処理本数は、一度に10本程度である。また、従来の方法を自動化した機器も開発されているが、このような機器も一般的に高価であったり、処理サンプル数が少ない等の欠点を有しており、実用的には問題があった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 形質転換法は、遺伝子操作の基本技術であり、ライフサイエンスあるいはバイオテクノロジーの研究開発にとって不可欠である。したがって、この方法によって得られた形質転換体（特に、大腸菌等を形質転換したもの）から核外遺伝子DNAを、高い安全性のもとに、短時間かつ高純度で抽出精製することが望まれていた。

【0004】 そこで、本発明の目的は、形質転換体で複

2

製増幅された核外遺伝子DNA（プラスミドDNA）を、終夜培養液から安価に抽出精製することのできるDNA抽出精製方法及び装置を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】 上記目的を達成するため、請求項1の発明の要旨は、(1) 形質転換体培養液を第1のDNA抽出精製用カートリッジに集菌する工程、(2) 溶菌及び不要RNAの分解工程、(3) 第1のDNA抽出精製用カートリッジによる不純物濾過工程、(4) 第2のDNA抽出精製用カートリッジでDNAを吸着、洗浄、溶出する工程を含むプラスミドDNAの抽出精製方法にある。

【0006】 上記目的を達成するため、請求項2の発明の要旨は、少なくとも形質転換体捕集兼溶菌用フィルター（本明細書中では、トラップフィルターという）及びメンブランフィルターを含む第1のDNA抽出精製用カートリッジと、少なくともガラス繊維フィルターとガラスパウダー層とメンブランフィルターとを含む第2のDNA抽出精製用カートリッジとを含むDNA抽出精製装置にある。

【0007】 本発明にかかるDNAの抽出精製方法は、より詳しくは、以下の工程を含むことが好ましい。

【0008】 (1) 形質転換体培養液を第1のカートリッジに集菌する工程

この工程に先だって、形質転換体の終夜培養液を調製する。ここで、本発明の適用の対象となる形質転換体としては、大腸菌 [例えば、大腸菌 J M 1 0 1 (ATCC 3387 6), 大腸菌 H B 1 0 1 (ATCC 33694), 大腸菌 J M 1 0 9 (ATCC 53323) 等] を宿主微生物として、これを形質転換した形質転換体が代表的なものであるがこの他にアルカリ溶菌が可能な微生物を宿主とした形質転換体からの核外遺伝子DNAの抽出精製にも用いることができる。この形質転換は、当業者にとって公知の常法（例えば、Hanahan, D., 1983, J. Mol. Biol., 166, 577）に従って行うことができる。上記終夜培養液は、通常適当な選択培地に数時間終夜培養される。選択培地としては、大腸菌の形質転換体の場合、プラスミド内の薬剤耐性遺伝子のため、アンピシリン (ampicillin) を代表とする抗生物質を含むLB (Luria Bertani) 培地が好ましいが、この他にも、NZCYM培地、SOC培地等を用いることができる。本発明の目的の達成を阻害しない限り、これらに限定されるものではなく、当業者にとって公知の他の培地を用いることができる。すなわち、窒素源、炭素源、リン酸塩、マグネシウム塩、微量成分等を含む天然もしくは人工培地を使用することができる。

【0009】 本工程では、調製された終夜培養液を、第1のDNA抽出精製用カートリッジに分注する。

【0010】 このように、終夜培養液を分注した第1のDNA抽出精製用カートリッジに真空ポンプによる減圧操作あるいは遠心分離操作を施し、形質転換体を第1の

3

DNA抽出精製用カートリッジ上に集菌する。すなわち、第1のDNA抽出精製用カートリッジのトラップフィルターの立体網目構造に捕集され、形質転換体が集菌される。

【0011】(2) 溶菌及び不要RNAの分解工程

この工程では、溶菌用試薬を第1のDNA抽出精製用カートリッジのトラップフィルター上に添加し、形質転換体を溶菌させ、核外遺伝子(プラスミドDNA)を細胞外に溶出させる。また、この工程では、同時に溶菌用試薬によって不要なRNAを消化する。したがって、上記溶菌用試薬は、溶菌を行うための溶菌酵素とRNAを消化するためのRNA分解酵素(リボヌクレアーゼ)を含むことが好ましい。溶菌酵素としては、例えば、細菌細胞壁加水分解酵素であるリゾチーム(lysozyme)を用いることができ、RNA分解酵素としては、例えば、リボヌクレアーゼA(RNaseA)を使用することができる。これらは、一種のみを単独で用いても良く、また二種以上のものを組み合わせて用いることもできる。溶出させる核外遺伝子(プラスミドDNA)は、周知のとおりベクターとして利用されるものであり、ここでいうプラスミドDNAには、コスミドDNAも当然含まれる。この工程は、溶菌用試薬を第1のDNA抽出精製用カートリッジのトラップフィルターに添加した後、室温にて5-10分間放置して行われる。

【0012】(3) 第1のDNA抽出精製用カートリッジによる不純物濾過工程

上記(2)の工程を終えた後、第1のDNA抽出精製用カートリッジのトラップフィルター上に、試料の完全可溶化処理のための試薬、例えば、0.2N水酸化ナトリウム・1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液を適量添加し、室温にて2-5分間放置することにより、試料の完全可溶化処理を行う。次いで、例えば、3M酢酸カリウム(pH4.8)を適量添加して、室温にて3-5分間放置し、塩基性溶液を中和するとともに、細胞構成タンパク質及び染色体DNAを凝固処理する。そして、第1のDNA抽出精製用カートリッジ(当初集菌したもの)に真空ポンプによる減圧を用いた濾過操作あるいは遠心分離による濾過操作を施し、プラスミドDNAを含む抽出液を分離する(第1のDNA抽出精製用カートリッジの下部より抽出される)。

【0013】(4) 第2のDNA抽出精製用カートリッジでDNAを吸着、洗浄、溶出する工程

この工程では、まず、上記(3)の工程で得られた抽出液及び等量のDNA吸着のための試薬、例えば、8Mヨウ化ナトリウムNaIを第2のDNA抽出精製用カートリッジに添加する。これは、ガラスパウダーへのDNA吸着はカオトロピックイオン(chotropic ion)存在下で促進されることに基づいている。さらにアガロースゲル電気泳動で分離したDNA断片をアガロースゲルから抽出精製する方法にもガラスパウダーへのDNA吸着法が

4

応用されている(Vogelstein, B.及びD. Gillespie, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:615)。カオトロピックイオンを生成する試薬として、 LiClO_4 , KI , NaI , LiCl , NaCHO_2 等があるが、 NaI (ヨウ化ナトリウム)の入手が容易である。次いで、この第2のDNA抽出精製用カートリッジに、真空ポンプによる減圧を用いた操作あるいは遠心分離による操作を施し、プラスミドDNAを、吸着させる。このカートリッジは、後述するように、ガラス繊維フィルター(二層)とガラスパウダー層とメンブランフィルターとから成る少なくとも四重の構造である。プラスミドDNAは、主として、ガラスパウダー層に吸着される。さらに、この第2のDNA抽出精製用カートリッジに洗浄用緩衝液、例えば、10mMトリス塩酸(pH8.0)・1mM EDTA・0.2M NaCl・50%エタノールを添加し、真空ポンプによる減圧を用いた操作あるいは遠心分離による操作を施し、洗浄を行う。最後に、この第2のDNA抽出精製用カートリッジに、溶出用緩衝液例えば、滅菌蒸留水/10mMトリス塩酸(pH8.0)・1mM EDTAを50-100 μ l添加して、真空ポンプによる減圧を用いた操作あるいは遠心分離による操作を施し、プラスミドDNAのみを溶出精製する。

【0014】

【実施例】以下に、本発明にかかるDNA抽出装置を添付図面に示した実施例を参照しながら説明し、続いて、このDNA抽出装置を用いて行った本発明にかかるDNA抽出方法の試験例を説明する。しかし、これらの実施例あるいは試験例は、本発明の技術的範囲を限定する意図のものではなく、本発明の技術的思想の範囲内における、変更、付加、修飾は全て本発明の技術的範囲に含まれる。

【0015】図1は、本発明にかかるDNA抽出装置のうち、第1のDNA抽出精製用カートリッジの実施例を示し、図において、1はトラップフィルター、2はメンブランフィルター、3はカートリッジ容器である。

【0016】トラップフィルター1は、主として形質転換体である大腸菌等の菌体を捕集し、溶菌するための層である。材質としては、ガラス繊維フィルターやポリエチレン樹脂フィルターや不織布フィルター等が好ましく、大腸菌等の菌体を立体的に捕集する特性を備えていることが好ましい。具体的には、東洋濾紙社製のガラス繊維フィルター、スペイシーケミカル社製のポリエチレン樹脂フィルター等を使用することができる。

【0017】メンブランフィルター2は、主として凝固タンパク、染色体DNA等の不要物の濾過・除去のための層である。材質としては、酢酸セルロース、ポリフッ化ビニリデン等が好ましく、生物学的不活性、低タンパク吸着性の特性を備えていることが好ましい。具体的には、東洋濾紙社製のセルロースアセテートタイプメンブ

5

ランフィルター、ミリポア社製のデュロポアメンブラン等を使用することができる。

【0018】カートリッジ容器3は、通常、外容器及びフィルター固定用内筒で構成し、本体部分は、通常、円柱状とし、大きさとしては、 $\phi 10 \sim 20 \text{ mm}$ 、長さ30～50 mmのものを使用することができる。

【0019】なお、図1の実施例では、トラップフィルター1、メンブランフィルター2、カートリッジ容器3のみを模式的に表示しているが、必要に応じて他にマイクロチューブを設けることもできる。また、このようなカートリッジを使用する際に、必要な周辺機器、例えば、遠心機もしくは真空ポンプ及び吸引用カートリッジスタンドを、本発明の適用に伴って使用する。

【0020】図2は、本発明にかかるDNA抽出装置のうち、第2のDNA抽出精製用カートリッジの実施例を示し、図において、21はガラス繊維フィルター、22はガラスパウダー層、23はガラス繊維フィルター、24はメンブランフィルター、25はカートリッジ容器である。

【0021】ガラス繊維フィルター21、23は、主としてプラスミド吸着補助のための層である。材質としては、微細ホウケイ酸塩ガラス繊維等が好ましく、生化学的液体に対して不活性の特性を備えていることが好ましい。具体的には、東洋濾紙社製のGA-100、200、GC-50、ワットマン社製のGFシリーズ等を使用することができる。

【0022】ガラスパウダー層22は、主としてDNA吸着のための層である。材質としては、シリカマトリックス等が好ましく、水中沈降速度0.25 cm/min以下の特性を備えていることが好ましい。具体的には、旭硝子社製のガラスパウダー、BIO101社製のGLASSMILK™等を使用することができる。

【0023】メンブランフィルター24、カートリッジ容器25の機能及び材質等は、上記した図1のメンブランフィルター2、カートリッジ容器3と同様である。

【0024】第2のDNA抽出精製用カートリッジ作製はメンブランフィルター、ガラス繊維フィルターを順に積層した後、ガラスパウダー懸濁液20～100 μl を添加する。このカートリッジを減圧吸引ないしはスイングロータで遠心してガラスパウダーをガラス繊維フィルター上に均一に密着させ、さらにガラス繊維フィルターを積層して四重の層構造カートリッジを作製する。

【0025】なお、図2の実施例では、ガラス繊維フィルター21、ガラスパウダー層22、ガラス繊維フィルター23、メンブランフィルター24、カートリッジ容器25のみを模式的に表示しているが、必要に応じて他にカートリッジフィルターの下に精製DNA溶出液を受けるマイクロチューブを設けることもできる。また、このようなカートリッジを使用する際に、必要な周辺機器、例えば、遠心機もしくは真空ポンプ及び吸引用カー

6

トリッジスタンドを、本発明の適用に伴って使用する。

【0026】上記第1、第2のDNA抽出精製用カートリッジの各々の層を構成する素材は、それら自体市場において安価に入手できるものである。したがって、本発明にかかる装置の提供にあたり製造上のコスト的負担は小さい。

【0027】次に、上記図1、図2に示した第1、第2のDNA抽出精製用カートリッジを用いて行った本発明にかかるDNA抽出精製方法の試験例を示す。

【0028】試験例

(1) 形質転換体培養液を第1のカートリッジに集菌する工程

この工程に先だって、形質転換体の終夜培養液を調製した。大腸菌 [*E. coli* HB101 (ATCC 33694)] を宿主微生物として、これを Hanahan の方法 (Hanahan, D., 1983, J. Mol. Biol., 166, 577) に従い形質転換した形質転換体を使用した。選択培地としては、アンピシリン (ampicillin) を含むルリア・ベルタニ (Luria Bertani) 培地を使用した。この培地の組成は、以下のとおりであった。

Bacto-tryptone	: 10 g/L
Bacto-yeast extract	: 5 g/L
NaCl	: 10 g/L
Ampicillin	: 35～50 mg/L

水酸化ナトリウムによってpHを7.5に調整した。この培地3 mlを使用して、終夜培養を行った。なお、培地の容量は、図1、図2の第1、第2のDNA抽出精製用カートリッジを用いる場合、1～3 mlとすることが好適である。調製された終夜培養液を、第1のDNA抽出精製用カートリッジに分注した。このように、終夜培養液を分注した第1のDNA抽出精製用カートリッジに遠心分離操作を施し、形質転換体を第1のDNA抽出精製用カートリッジのトラップフィルターに捕集した。

【0029】(2) 溶菌及び不要RNAの分解工程

200 μl の溶菌用試薬を上記第1のDNA抽出精製用カートリッジのトラップフィルターに添加し、形質転換体を溶菌させ、核外遺伝子 (プラスミドDNA) を細胞外に溶出させた。また、この工程で、同時に溶菌用試薬によって不要なRNAを消化した。上記溶菌用試薬は、溶菌酵素としては、リゾチーム (lysozyme) を含み、RNA分解酵素として、リボヌクレアーゼAを含むものをを使用した。本工程は、溶菌用試薬を第1のDNA抽出精製用カートリッジのトラップフィルターに添加した後、室温にて10分間放置して行った。

【0030】(3) 第1のDNA抽出精製用カートリッジによる不純物濾過工程

上記(2)の工程を終えた後、第1のDNA抽出精製用カートリッジのトラップフィルターに、試料の完全可溶化処理のための試薬として0.2 N水酸化ナトリウム・1 %ラウリル硫酸ナトリウム溶液を400 μl 添加し、室

7

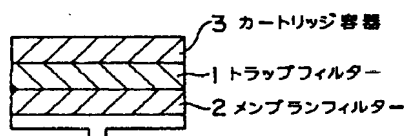
温にて5分間放置することにより、試料の完全可溶化処理を行った。次いで、3M酢酸カリウム(pH4.8)を300 μ l添加して、室温にて5分間放置し、塩基性溶液を中和するとともに、細胞構成タンパク質及び染色体DNAを凝固処理した。そして、第1のDNA抽出精製用カートリッジ(当初集菌したもの)に遠心分離による濾過操作を施し、プラスミドDNAを含む抽出液を分離した(第1のDNA抽出精製用カートリッジの下部より抽出した)。

【0031】(4) 第2のDNA抽出精製用カートリッジでDNAを吸着、洗浄、溶出する工程

この工程では、まず、上記(3)の工程で得られた抽出液及び等量のDNA吸着のための試薬として8Mヨウ化ナトリウムNaIを第2のDNA抽出精製用カートリッジに添加した。次いで、この第2のDNA抽出精製用カートリッジに、遠心分離による操作を施し、プラスミドDNAを、このカートリッジのガラス繊維フィルター及びガラスパウダーに吸着させた。。さらに、この第2のDNA抽出精製用カートリッジに洗浄用緩衝液として、10mMトリス塩酸(pH8.0)・1mM EDTA・0.2MNaCl・50%エタノールを350 μ l添加し、遠心分離による操作を施し、洗浄を行った。最後に、この第2のDNA抽出精製用カートリッジに、溶出用緩衝液として、蒸留水/10mMトリス塩酸(pH8.0)・1mM EDTAを100 μ l添加して、遠心分離による操作を施し、プラスミドDNAのみを溶出精製した。

【0032】図3に、上記試験例で精製されたプラスミ

【図1】



8

ドDNAのアガロースゲル電気泳動分離の結果を示す。夾雑物であるRNA、染色体由来DNA、タンパク質の混入は全く見られず、塩化セシウム密度勾配超遠心分離精製プラスミドDNAと同等以上の純度が得られた。したがって、各種解析実験に支障なく使用可能であることが確認された。

【0033】

【発明の効果】以上より明らかなように、本発明によれば、形質転換体で複製増幅された核外遺伝子DNA(プラスミドDNA)を、終夜培養液から安価に抽出精製することのできるDNA抽出精製方法及び装置が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】第1のDNA抽出精製用カートリッジの構造を示す模式図である。

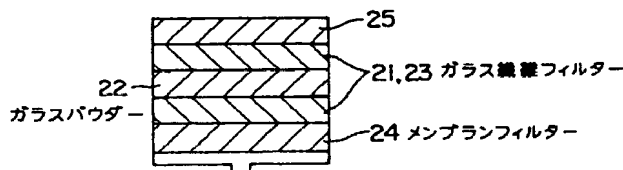
【図2】第2のDNA抽出精製用カートリッジの構造を示す模式図である。

【図3】試験例の電気泳動の結果を示すグラフである。

【符合の説明】

- 1 トラップフィルター
- 2 メンブランフィルター
- 3 カートリッジ容器
- 21 ガラス繊維フィルター
- 22 ガラスパウダー層
- 23 ガラス繊維フィルター
- 24 メンブランフィルター
- 25 カートリッジ容器

【図2】



【図3】

アガロースゲル電気泳動分離結果

A B C



レーン A : 分子量マーカー
B : 塩化セシウム密度勾配
遠心分離精製プラスミド
C : 本法精製プラスミド